

高效液相色谱法 及其在食品分析中的应用

北京大学出版社

DF45/17
高效液相色谱法
及其在食品分析中的应用

李明元 主编



北京大学出版社

高效液相色谱法 及其在食品分析中的应用

主 编

李明元

副主编

翟永信 叶世柏

编 委

方 荣 张伟基

张洪祥 姚仲刚

*

北京大学出版社出版

(北京大学校内)

北京昌平百善印刷厂印刷

光谱学与光谱分析编辑部发行

(北京市海淀区魏公村学院南路76号)

*

787×1092毫米 16开本 10.75印张

1988年9月第1版 1988年9月第一次印刷

统一书号: ISBN7-301-00528-8/O-107

定价: 4元

前 言

高效液相色谱法 (HPLC) 是近二十年来发展起来的一项分离分析技术, 由于它具有适用范围广、分离效率高、速度快、用样量少、可以收集被分离的组分、灵敏度高、柱可以反复使用、安全、自动化程度高等优点, 加上普及面扩大, 以及新的科学技术应用, 尽管出现的晚却在诸多分析技术及方法上后来者居上。1977年色谱的国际性学术杂志为此发表两册专刊。1979年 *Analytical Chemistry* 杂志载文叙述了高效液相色谱发展状况, 同年, 日本原昭二教授主编了“最新液体クロマトグラフィー基礎と应用”一书, 系统介绍了高效液相色谱法的理论及在各方面应用实例。尔后, 新型高效液相色谱分析仪器不断出现, 专用氨基酸分析仪、离子色谱仪等出现, 有关的学术资料大大的增加, 许多厂商也编辑了应用手册, 为使用高效液相色谱提供了许多方便。我国在食品分析中应用高效液相色谱是七十年代末开始的, 天

津、北京、辽宁、河北……食品卫生检验部门应用高效色谱法分析检验食品卫生质量及产品质量、检验食品污染物、食品营养成分、食物中毒等都作了不少工作。1987年在承德召开了“高效液相色谱在食品分析中应用学术会”, 近百名代表交流了百余篇近期学术论文, 并请有关专家作了专题学术报告, 为在食品分析上应用高效液相色谱起到了推动作用。尽管如此, 由于仪器价格昂贵, 普及面不广, 资料还是缺乏的, 编者为了使高效液相色谱更好地应用, 用实践中的经验结合高效液相色谱理论, 用国外有关的资料结合实际应用技术, 深入浅出、通俗易懂的方式编写本书, 以供从事高效液相色谱分析食品的同行借鉴。但由于编者水平所限, 挂一漏万、欠妥之处难免, 敬请读者斧正。

在编写中承蒙沃特斯 (Waters) 公司提供资料, 在此表示感谢。

目 录

第一章 概述	(1)
第二章 高效液相色谱法基础	(4)
2.1 基础理论	(4)
2.2 分类和原理	(8)
2.3 高效液相色谱仪	(32)
2.4 氨基酸分析仪和离子色谱仪	(52)
2.5 分离条件的选择	(73)
2.6 定性和定量方法	(83)
第三章 样品预处理	(92)
3.1 取样与调制	(92)
3.2 提取方法	(92)
3.3 净化操作	(93)
3.4 浓缩	(95)
3.5 实例	(96)
第四章 食品添加剂的分析	(97)
4.1 着色剂	(97)
4.2 甜味剂	(109)
4.3 防腐剂	(112)
4.4 发色剂	(117)
4.5 抗氧化剂	(118)
第五章 食品污染物的分析	(124)
5.1 霉菌毒素	(124)
5.2 多环芳烃	(128)
5.3 亚硝胺	(129)
5.4 多氯联苯	(132)
5.5 抗生素及抗菌药物	(133)
第六章 无机成分的分析	(142)
第七章 食品营养成分的分析	(147)
7.1 氨基酸	(147)
7.2 碳水化合物	(151)
7.3 脂肪酸	(155)
7.4 有机酸	(161)
7.5 维生素	(162)

第一章 概 述

高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography简称HPLC) 又称高压液相色谱法 (High Pressure Liquid Chromatography)、或称高速液相色谱法 (High Speed Liquid Chromatography); 它是色层法的一个分支和组成部分。高效液相色谱法是在液相柱层析基础上, 引入气相色谱法理论并加以改进而发展起来的一门新兴色谱学。

色层的首创和发展是与发现和研究吸附现象分不开的, 早在1875年 Т. Е. Ловиц (1872—1919) 发现木炭能够吸附溶液中的有色物质, 并用其在制备酒石酸时脱色。以后又用木炭脱掉白酒中的异味。但首先将吸附现象应用在分析工作上的是植物学家 Михаил Семенович Цвет, 他在1903年发表的“论新颖的吸附现象及其在生物化学分析中的应用”一文中介绍了色层法。以后, 他又在实践和理论上做了论证。1906年他详细介绍了在分离植物色素混合物时所获得的实验结果, 在其经典著作“动植物界的色素”中说: 当有色物质混合物 (植物色素) 的溶液滤经吸附剂柱层时, 这些物质被层层分开, 形成有色区带, 便于定性和定量。Цвет将此现象用希腊语“Chroma” (色) 和“graphos” (谱) 二个字合并成“色谱”即为“Chromatography”。但是, 色谱法不仅能分离有色物质, 实践证明还广泛应用于无色的物质分离, 而且又发展成多种形式, 所以, “色谱法”名字虽然仍在沿用, 但已失去了原来的意义。遗憾的是 Цвет 过早的逝世, 这方面研究拖了很久没有什么进展, 直到1931年 R. Kuhn等利用氧化铝和碳

酸钙层析柱分离制备了胡萝卜素取得成功之后, 色谱法才得到真正发展。1941年, Martin和Synge研究成分配色层法。在此之前层析法的形式主要是柱层析 (Column chromatography)。1944年, Consden, Grodon和Martin等又研究成功用滤纸作担体的“纸层析” (Paper Chromatography简称PC), 氨基酸等一些极性化合物能够很好地被分析了。1952年, Martin, James等发展了气液层析, 由于高灵敏度的检测器不断出现, 使气相色谱 (Gas Chromatography简称GC) 成为当今分析领域中最重要手段之一。在纸层析法出现之前, 1938年Shraiber首先用氧化铝铺在玻璃板上分离生物碱, 形成了薄层层析的初形, 但由于吸附剂粒度、粘合等问题影响了发展。到1951年时Kirchner开始使用淀粉作粘合剂分离精油成功, 又发表了许多文章。Stahl对这项技术又作了许多工作并使之标准化。到1956年通过国际学术会议正式确定了薄层层析 (thin layer Chromatography简称TLC)。比起TLC、GC来HPLC发展是很慢的, 用离子交换柱分离、精制氨基酸, 研究改良填充剂和提高速度时, 才使人们注意这项技术研究。1967~1969年间Huber, Kirkland做了不少实验, 在柱层析的理论和实验基础上, 利用了GC法塔板等有关理论和先进技术, 研制成HPLC。由于HPLC具有其它许多仪器不可比拟的优点, 从而使这项技术各个领域中的分析定量、定性得到了飞速发展。

目前液相色谱发展成四大类别:

1. 液固 (吸附) 色谱 (LSC) 指固定相为固体细粒时, 由高压流动相展开的

色谱过程,适用于分子量300~1000的样品组分,而不适用于极性的,或离子型水溶液的样品的分离。

2. 液液(分配)色谱(LLC) 指固定相为细粒所支持的表面液膜,它与高压流动相所溶样品组分达成液液分配,而展开的色谱,这种色谱又分成两种:(1)正相(Normal)色谱,其固定相为极性液体,而流动相为非极性溶剂,如正己烷等。(2)反相(Reverse Phase)色谱,固定相为非极性液体,而流动相为极性液体,如水、甲醇、乙腈等。

3. 离子交换色谱 指用离子交换剂来填充色谱柱,亦即固定相为高度极性而形成的色谱。由于样品组分与色谱柱中离子交换剂发生离子交换,于是不同组分的保留时间也不同。这种色谱又分成两种,(1)用阳离子交换树脂填充柱的叫做“阳离子交换色谱”,(2)用阴离子交换树脂填充柱的叫做“阴离子交换色谱”。

4. 排阻色谱 这类色谱与凝胶过滤色谱、或筛析色谱,皆属于同一类型,亦即其固定相是一种多孔性的分子筛,例如葡聚糖凝胶(商品名Sephadex)。择用的凝胶筛孔大小,应与待测分子的大小相适应。如此,即迫使样品组分中分子量较小者,渗入胶体而不易流出,表现为保留时间较长;而分子量较大的组分,则沿凝胶的孔隙而容易流出,其保留时间较短,从而形成色谱分离。该法常用于分子量>2000的样品组分,它与前述的吸附,分配,或离子交换法不同,亦即对样品中某一独特组分,反而不容易与其它组分分离。因为本法实质上近似分馏过程,因而适合于彼此相近的组分,亦即狭窄馏份的分离。

高效液相色谱法具有许多其它分析法所不具有的优点,它不仅具有层析法共有的优点,即分离分析,比起其它层析法来说,也有许多优点。例如,气相色谱法,虽也具

有快速、分离效率高,用样量少等优点,但它要求被测样品能够气化,受样品的挥发性限制。在所有的化合物(总数约为300万个)中可以直接用气相色谱法分析的物质仅占20%。对于挥发性差或热不稳定的化合物,虽然可以采取裂解、硅烷化、酯化等预处理的方法处理,再进行气相色谱分析,但必竟增加了操作上的麻烦且常常改变被测组分的面目。可是,高效液相色谱法,只要求样品能够制成溶液,而不需要气化,因此不受样品挥发性的约束。对于挥发性低、热稳定性差、分子量大的高分子化合物以及离子型化合物尤为有利,例如,氨基酸、各种色素、添加剂、蛋白质、生物碱、核酸、甾体、类脂、维生素、农药、抗生素、无机质、致癌物质、污染物、有机酸、糖类等等等都可以应用高效液相色谱进行分离分析。而且还可以保留被分析物质原来面目,从而可制备一些纯物质。与气相色谱法比较,高效液相色谱还具有可选择两种色谱相(流动相和固定相)与样品分子互相作用;而气相色谱只能选择一种色谱相(固定相),因为流动相(载气)不与样品分子发生作用。因此高效液相色谱就增加了一个可供选择的参数,可选择适宜的流动相以利于物质的分离。此外,高效液相色谱有较多的可供使用的柱填充物(固定相),这就使色谱分离有更大的可能性。再者,高效液相色谱所需要的分离温度较低(较低温度有利于分子间的相互作用),所以高效液相色谱经常可在接近室温的条件下工作。正因为高效液相色谱比气相色谱具有如此之多的优点,所以有机物总数量的80~85%可采用高效液相色谱法分析。

高效液相色谱具有以下一些特点:

1. 高压 高效液相色谱以液体作为流动相,液体流经色谱柱时受到的阻力较大,为了迅速地通过色谱柱,必须对流动相施加高压。在现代液相色谱中供液压力和进

样压力都很高，一般可达到 $150\sim 300\text{kg}/\text{cm}^2$ 。色谱柱的降压每米在 $75\text{kg}/\text{cm}^2$ 以上。高压是高效液相色谱法的一个突出的特点。因为液体不同于气体，它不易被压缩，且液体内部的势能较低，所以在这里使用高压并没有爆炸的危险性。

2. 高速 高效液相色谱所需要的分析时间较之经典液体色谱少得多，一般都不少于1h。例如分离苯的羟基化合物七个组分，只要1min就可以完成。流动相在色谱柱内的流速较之经典液体色谱高得多，一般可达 $1\sim 10\text{ml}/\text{min}$ ，个别可达 $100\text{ml}/\text{min}$ 以上，这已近似于气相色谱的载气流速。

3. 高效 气相色谱的分离效能很高，柱效约为2000塔板/米；而高效液相色谱的柱效则更高，约可达5000塔板/米；这是由

于近年来研究出了许多新型固定相（如化学键合固定相），使分离效率大大提高，有时一根柱子可以分离100种以上的组分。

4. 高灵敏度 高效液相色谱已广泛采用高灵敏度的检测器，进一步提高了分析的灵敏度。如紫外检测器的最小检测量可达 10^{-9}g ；荧光检测器的灵敏度可达 10^{-11}g 。高效液相色谱高灵敏度还表现在用样量少，微升数量级的样品就足以满足分析需要。

由于高效液相色谱法具有适用范围广、分离效率高、速度快、流动性可选择性范围宽、灵敏度高、色谱柱可反复使用、流出组分容易收集、安全等优点，尽管高效液相色谱出现较晚，但在应用上已扩展到各个分析领域，在食品分析上也得到广泛应用。

第二章 高效液相色谱法基础

2.1 基础理论

2.1.1 液相色谱图 样品经色谱柱获得分离, 其分离是以淋洗方式进行的, 洗脱时间是流动相流速的函数。分离出的组份按次序进入检测器, 并将各组份的浓度变化转换为相应的电信号, 由记录仪记录响应信号与时间关系的曲线即为色谱图。色谱图是色谱柱分离结果的反映, 是定性、定量的依据, 也是研究色谱过程机理的依据。典型色谱图如图2—1所示。

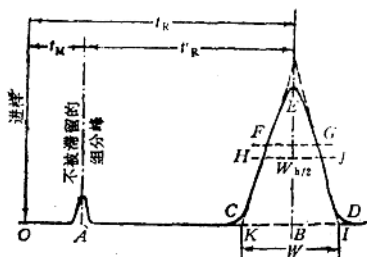


图2—1 典型微分色谱图

2.1.1.1 基线 液相色谱在正常操作的条件下, 仅有流动相通过检测器系统时所产生的响应信号(所绘制的曲线)称基线。

【基线漂移】基线随时间定向的缓慢变化

【基线噪音】由于各种因素所引起的基线波动信号, 可以用于检出限的计算。

2.1.1.2 色谱峰 从色谱柱流出的组份通过检测器系统时所产生的响应信号(记录的微分曲线)称色谱峰。

【峰底】从峰的起点与终点之间连接的直线。图2—1中CD。

【峰高】从峰的最大值到峰底之间的距离。图2—1中EB。用h表示。

【峰宽】在峰两侧拐点(F、G)处作切线与峰底相交两点(K、I), 之间距离称峰宽用W表示。

【半高峰宽】通过峰高的中点作平行于峰底的直线, 该直线与峰两侧相交两点(H、J), 之间的距离称半高峰宽。用图2—1中 $W_{1/2}$ 表示。

【峰面积】峰与峰底之间的面积, 图2—1中的CHEJD所围成的面积, 用A表示。

2.1.1.3 色谱峰的类型

【对称峰】正态分布的高斯曲线, 如图2—2中 $a=b$ 。在色谱分离中峰绝对的对称是较少见的。一般流出快的色谱峰对称性差, 保留时间长些的相对对称性好些。

【拖尾峰】不对称峰, 图2—2中 $a < b$, 而且后沿平缓。这种类型多见, 是由于分配系数或吸附特性的不同而产生的。

【前伸峰】前沿较后沿平缓的不对称峰, 图2—2中 $a > b$ 。

【峰变形程度的确定】在峰10%处截取峰宽, 从峰顶向峰底作垂线, 把截取峰宽度分成a和b二部分, 以 $\frac{b}{a}$ 值来确定峰的不对称程度。见图2—2。

【峰宽度的正确量取】色谱峰由记录仪描记, 其笔线都有一定的宽度, 正确的测量方法如图2—3所示。测量峰宽的误差会影响柱效率计算的精度。

2.1.1.4 进样标记 多数的HPLC色谱仪有微处理机, 进样后按下START, 微机就开始记时。液相色谱进样不象气相色谱

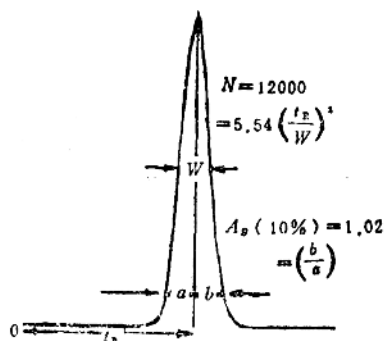


图2-2 色谱峰对称性的确定

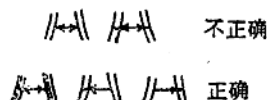


图2-3 峰宽度的测量

进样会出现冲击信号,冲击信号可以作为进样的标记。当使用停泵进样时,流动相的波动也会有信号的变化。进样标记用图2—1中的O表示,是保留值计算的起始点。

2.1.1.5 不被滞留的组份峰 选一在分离柱上是惰性(但绝对的惰性物质是不存在的,只是该物质与柱子亲和力较小),又能在检测器上产生信号的物质。这种物质所产生的色谱峰称不被滞留的组份峰。用图2—1中的A表示。其意义可确定色谱分离死时间或死体积,而死体积是柱的结构和检测池等装置的体积。死体积越大,流动相中的溶质越易扩散,使分离度下降。

2.1.2 液相色谱主要参数

2.1.2.1 保留值 保留值是表示样品中各组份在色谱柱中的停留时间的数值或表示流动相将组份带出色谱柱所需要的液体体积。当色谱参数控制一致时,同种物质具有相同的保留值,所以是定性判断的依据。

【死时间】 惰性物质通过色谱系统所需的时间,用图2—1中 t_M 表示。或用OA距离表示。

【死体积】 当流动相以流量(F)流

出,乘以流出死时间 t_M ,即为惰性物质流出的死体积。用下式表示:

$$V_0 = t_M \cdot F \quad (2.1)$$

【保留时间(t_R)】 组份从进样到峰最大值所需的时间。用图2—1中 t_R 表示。

【保留体积(V_R)】

组份从进样到峰最大值所需流动相的体积。当进样器、检测器死体积都很小时,可用保留时间乘以流量表示:

$$V_R = t_R \cdot F \quad (2.2)$$

【调整保留时间(t_R')】 保留时间减去死时间为调整保留时间。或称实际保留时间,用下式表示:

$$t_R' = t_R - t_M \quad (2.3)$$

【调整保留体积(V_R')】 保留体积减去死体积的保留体积称为调整保留体积或称实际保留体积,用下式表示:

$$V' = V_R - V_M \quad (2.4)$$

【相对保留值($\alpha_{i,s}$)】

在相同操作条件下,组份与参比组份的调整保留值之比,或分配系数之比。

$$\alpha_{i,s} = \frac{t'_{R(i)}}{t'_{R(s)}} = \frac{V'_{R(i)}}{V'_{R(s)}} = \frac{K_i}{K_s} \quad (2.5)$$

式中: i 为物质组份, s 为参比组份。

相对保留值的意义在于能近似观察流动相的溶剂效率。相对保留值不受流动相流速的影响。因此, α 值称为分离选择性。

2.1.2.2 柱渗透率和压降 渗透率是描述流动相通过填充柱受阻状态的物理量。对分析时间起着决定性作用,希望液相色谱柱渗透率适中,压降小。

以下列二种方式对渗透率进行解释。

1. 对规则填充柱来说阻力主要受固定相粒度、柱孔隙度及流动相粘度的影响

(1) 非多孔微粒(如玻璃微粒)柱孔隙度 ϵ 可以表示为:

$$\epsilon = \frac{\text{液相空间}}{\text{柱总容积}} \quad (2.6)$$

一般对玻璃微粒 $\epsilon=0.42$,以此值作为规则

填充柱孔隙度。多孔微球柱孔隙度为玻璃微球的二倍。

(2) 柱渗透率用下式表示:

$$B_1 = \frac{B_0}{\eta} \quad (2.7)$$

式中: B_1 为柱渗透率, B_0 为比渗透率, η 为流动相的粘度。

(3) 比渗透率用下式表示:

$$B_0 = \frac{d_p^2}{180} \cdot \frac{\epsilon^3}{(1-\epsilon)^2} \quad (2.8)$$

式中: d_p 为固定相的粒度, ϵ 为柱孔隙度。

2. 柱渗透率又可以从压降及其它参数之间的关系求得

$$B_1 = \frac{F \cdot \eta \cdot L \cdot \epsilon}{\Delta P} \quad (2.9)$$

式中: F 为流动相的流量, η 为流动相的粘度, ϵ 为柱孔隙度, L 为柱长, ΔP 为柱两端压差。

2.1.2.3 分配系数 (K)

在平衡状态时组份在固定与流动相中的浓度之比, 用下式表示:

$$K = \frac{C_s}{C_L} \quad (2.10)$$

C_s 表示组份在固定相中的浓度, C_L 表示组份在流动相中的浓度。

2.1.2.4 容量因子 (K')

在色谱平衡状态时, 组份在固定相与流动相中质量之比, 用下式表示:

$$K' = \frac{\text{固定相中组份的质量}}{\text{流动相中组份的质量}} = K \frac{V_s}{V_L} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (2.11)$$

式中: K' 为容量因子, K 为分配系数, V_s 为组份在固定相中的体积, V_L 为组份在液相中的体积, t'_R 为调整保留时间, t_M 为死时间。

2.1.2.5 柱效能

色谱柱在色谱分离过程中主要由热力学和动力学因素决定的分离效能称柱效率。通常用理论塔板数、理论塔板高或有效塔板数表示。

【理论塔板数 (n)】 理论塔板数是描述物质在色谱柱中分配行为的半经验性质的理论, 把色谱柱拟为一个分馏塔, 并引用理论塔板数这个物理量来描述柱效率, 用下式表示; 其参数如图2-4所示:

$$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad (2.12)$$

式中: w_h 为半峰宽 ($w_h = 2.354\sigma$)、 w_b 为峰宽 ($w_b = 4\sigma$)。在实际工作中用圆规量取进样到峰顶的距离作为保留值。半峰宽也用线段表示, 这样计算很方便, 准确。(σ 为色谱峰高的标准偏差)

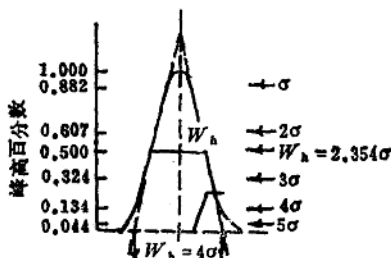


图2-4 峰宽与峰高的标准差的关系

w 表示峰宽, σ 标准差

例: 用萘测定某ODS柱的柱效, 进样到萘标准物质峰最高处的距离为70mm, $W_h = 2$ mm; 或用峰高标准差表示 $W_b = 4\sigma = 3.5$ mm。用二种方法计算理论塔板数?

解: 已知 $t_R = 70$ mm, $W_h = 2$ mm,

$$W_b = 3.5$$

$$\begin{aligned} (1) \text{ 根据 } n &= 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \\ &= 5.54 \times \left(\frac{70}{2} \right)^2 \\ &= 6786.5 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (2) \text{ 又根据 } n &= 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \\ &= 16 \times \left(\frac{70}{3.5} \right)^2 \\ &= 6400 \end{aligned}$$

通过上述计算知二种方法有差异, 一般

优选(1)法,其优点是简便,半峰宽用圆规量取比较准确;(2)法中 W_b 不如 W_h 好确定。

【理论塔板高(H)】柱长度与柱理论塔板数比值即单位理论塔板长度称理论塔板高,用下式表示:

$$H = \frac{L}{n} \quad (2.13)$$

式中: H 为理论塔板高, L 为柱长, n 为理论塔板数。 H 值越小,柱效能越高。

例:在二根ODS柱上用苈作标样测得理论板数分别为 $n_1=6700$, $n_2=5900$,柱长分别为 $L_1=200\text{mm}$, $L_2=150\text{mm}$ 。用理论板高比较柱效率:

$$\text{解: } H_1 = \frac{L_1}{n_1} = \frac{200}{6700} = 0.0299\text{mm/板}$$

$$H_2 = \frac{L_2}{n_2} = \frac{150}{5900} = 0.0169\text{mm/板}$$

$$\therefore H_1 > H_2$$

$\therefore$ 柱2的柱效率高

【有效塔板数(N)】计算方法与公式(2.12)基本相同,只是保留值用调整保留值代替,用下式表示:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R - t_M}{W_b} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t'_R}{W_b} \right)^2 \quad (2.14)$$

有效塔板数描述组份在实际分离状态下的柱效能,是高效液相色谱对物质分离度的主要参数之一。

2.1.3 分离度(R_s)

2.1.3.1 分离度的定义

分离度是定量描述混合物中相邻两组份在色谱柱中分离效能的主要指标,用 R_s 表示, R_s 值越大,两相邻色谱峰分离的越好。

2.1.3.2 公认的分度测量方法

如图2—5所示,两个组份保留值之差与其两峰平均峰宽值之比称为分离度。参数测定按图2—5方式进行,计算公式如下:

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1 + W_2} \right) \quad (2.15)$$

如果色谱峰宽用峰高的标准差表示时,

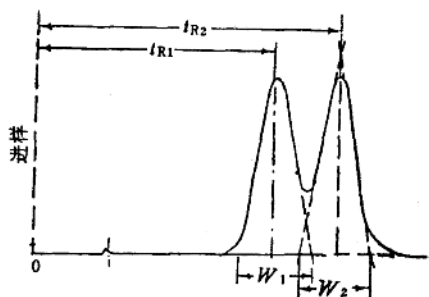


图2—5 分离度的测量方法

分离度可改写为下式:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{4\sigma} \quad (2.16)$$

当 $R_s=1$ 时,相邻二峰分离度相当 4σ 值,该值说明两组份的分离还存在2%的重叠。

$R_s=1.2$ 时,相邻两峰有比较明显的分离。

$R_s=1.4$ 时,相邻两峰完全分离。

2.1.3.3 以色谱过程热力学和动力学特征阐述分离度,其表达式如下:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K'}{1 + K'} \right) \sqrt{n} \quad (2.17)$$

式中: α 为相对保留值, K' 为容量因子, n 为理论塔板数。参数 α 和 K' 主要体现热力学特征, n 主要体现动力学特征。

相对保留值 α 的表达式如公式2.5所示,其数值可用直接量取色谱图相邻组份的净保留值求得。当 $\alpha=1$ 时,相邻两组份无热力学差异不产生分离。当 $\alpha \neq 1$ 时说明两组份有分配之差异,其差异大小体现两组份热力学差异大小。

容量因子 K' 如公式2.11所示。一般高效液相容量因子的数值为2~10,该值比气相色谱小是因为固定相和流动相的体积比值小所致,较小容量因子对高速流体有利对分离不利。

分离度与理论塔数平方根成正比,理论塔板数与柱长、固定相物理参数和化学性能有极大关系。

2.1.4 分离的选择性

液相色谱的分离选择性与气相色谱截然不同。因气相色谱中，气相间的相互作用可以忽略不计，只靠固定相提供热力学的分配差异而体现分离的选择性。而液相色谱，流动相对组份能直接产生分配差异，而这种差异有时在色谱分离过程中起着主要作用。另外，混合物的组份在分离时处在液相选择性竞争之中，这种现象可用溶剂效率表示。而在液相色谱中溶剂效率即该物质的相对保留值 α 。

相对保留值已作过讲述，是决定分离度的因素之一。色谱系统选择性越好，越易获得分离。

2.2 分类和原理

2.2.1 液-固吸附色谱法

(一) 概述 液固吸附色谱法是液相色谱方法中最古老的一种，过去称为柱色谱。在五十年代初期，出现了薄层色谱法。在1967年后才出现了现代的高效吸附色谱法。

吸附色谱法在高效液相色谱方法中是适应范围很宽的一种，它适用于分子量在200~1000之间的样品组分。而分子量低于200的组分，可以用气相色谱分离。它适用于非离子型化合物的分离；而离子型化合物，一般将得出很坏的拖尾峰。它也适用于可溶于有机溶剂的化合物，至于水溶性样品有时也能得到满意的结果。

吸附色谱法中常用的吸附剂是极性吸附剂，如硅胶、氧化铝或经过硅烷处理的吸附剂。在分离过程中，吸附色谱法对于同系物，极性相同的组分以及烷基取代程度不同的混合物，表现出很小的选择性；但是当组分分子中具有不同的官能团、或者不同数目的官能团，或者是异构物时，吸附色谱法将表现出更大的选择性。

(二) 固定相 现代吸附色谱法中，

首先值得考虑用作固定相的是硅胶，这是一种最常用的吸附剂。其次就应当考虑活性氧化铝。吸附剂可以分为极性和非极性两类。极性吸附剂，包括有各种含氧无机物，如硅胶、活性氧化铝、活性氧化镁、弗罗里希土、分子筛等。最常用的非极性吸附剂是活性炭。极性样品分子在极性吸附剂上可以优先受到滞留。如在硅胶上，大体按下述顺序（由 K' 最小至 K' 最大的顺序）排列：

饱和烃类<烯烃<芳烃≈有机卤化物<有机硫化物<醚类<硝基化合物<酯类≈醛类≈酮类<醇类≈胺类<磷酸盐<砷类<酰胺<羧酸。

极性吸附剂又可以分为酸性吸附剂和碱性吸附剂。酸性吸附剂中包括有硅胶和弗罗里希土；碱性吸附剂则有活性氧化铝和活性氧化镁（经过酸处理者除外）。从其吸附性能考虑，酸性吸附剂可以优先滞留如烷基胺和芳香胺等碱性化合物；同样碱性吸附剂，对一些酸性化合物呈现出更强的滞留，如吡咯衍生物、酚类、噻吩和羧酸等。

目前最常用的高效吸附剂的颗粒直径为5和10微米。一般在达到最佳柱效的条件下，5微米要比10微米的理论塔板数高三倍。其中最重要的特性是硅胶在pH较高的条件下趋向于溶解；因此，在选择色谱系统的流动相时，应给予注意。例如有的商品吸附剂，在使用的pH范围上规定了在pH为2到7.5范围内使用。而活性氧化铝在较高的pH条件下，具有更大的稳定性。

在常见的高效吸附剂中，即使同一种吸附剂，由于生产厂家及吸附剂型号的不同，在特性上也存在着相当差异。例如硅胶的比表面，最低的低于100米²/克，最高的比表面可达860米²/克。平常使用的硅胶，比表面平均在400米²/克。微孔直径有60Å和100Å两种。活性氧化铝具有较低的比表面和较大的平均微孔直径，它的充填密度也比硅胶高。除微粒型高效吸附剂之外，还有薄壳型吸附

剂,这种吸附剂是在微型玻璃球表面结合了一层1~2微米的吸附剂。薄壳型吸附剂具有较高的柱效。薄壳型吸附剂样品负荷量小,但至今仍然被使用。

(三) 吸附色谱法的分离机理 在吸附色谱法中使用的各种柱填料本身有着固有的吸附活性。这是指吸附剂都具有的吸附能力,这种能力可以把样品分子和溶剂分子从包围着吸附剂的流动相中吸引到吸附剂表面上,从而实现一定的浓缩。在色谱柱中,吸附剂表面对物质的吸引,可以看做处于动态平衡中。当样品分子还未引进色谱柱之前,可以认为流动相分子不断地在吸附剂表面发生吸附,接着又发生解吸,这种吸附和解吸处于平衡。因此任何已知分子在色谱柱内的吸附剂表面上发生吸附时,都将消耗一定的时间。当进样之后,流动相和吸附剂表面之间的动态平衡被扰乱,于是又发生了样品分子和流动相分子之间对吸附剂表面活性中心的竞争。这样样品分子与吸附活性中心的亲和力强时,就引起了已被吸附的流动相分子被排斥,而样品分子发生吸附。

在流动相中,流动相分子和样品分子之间也存在着相互作用,这趋向于样品分子被几个流动相分子包围起而溶剂化。这种附加的相互作用,使得整个色谱过程复杂化了。在这种情况下,样品分子分布于吸附剂表面和以溶剂化形式存在于流动相之间而达到平衡。同时,流活相分子的分布也类似这种情况。这种平衡状态,即使在流动相不流动的情况下也一直存在。在动态情况下,当流动相流经色谱柱时,已经证明样品分子在柱内的保留行为与吸附剂及平衡时的多种因素有关;这些因素是吸附剂样品分子,流动相分子,溶剂化了的样品分子,吸附力的相对大小,以及参与平衡时所有各种组分的浓度和温度的影响。

如上可述,当样品引进色谱系统之后,样品组分呈现出的保留行为与吸附剂对样品

分子的吸引有关,也与所选择的流动相有关。如果吸附剂对样品分子的吸附能力占压倒优势,而且极易将流动相分子从吸附剂上排除时,样品就被滞留在进样点附近。这种情况的可能结果是发生样品的不可逆吸附,或保留时间相当长。另一种情况是,达到吸附平衡时,流动相中的样品浓度较小,这时样品分子可以从色谱柱中流出,但保留时间较长。第三种情况是,达到吸附平衡时,流动相中的样品浓度较大,这种样品组分可以很快从色谱柱流出。

从吸附剂的表面状态考虑,在吸附剂表面上存在的吸附中心是不连续的。而样品分子与吸附中心之间发生最好的相互作用情况是,样品分子的官能团应当准确地与吸附中心相重合。这种情况对于只有一个官能团的样品分子是可以作到的;对于多官能团的样品分子就作不到了。但是也有些多官能团的样品分子,可以在吸附剂表面上实现良好的吸附。例如有的异构体,其中一种在吸附剂表面上具有极良好的吸附性能;但另一种就做不到,因而表现在 K' 值上相差很大。这就是吸附色谱法特别适于分离异构体的一种解释。

(四) 流动相

【溶剂强度 ϵ^0 】 改变流动相的溶剂强度 ϵ^0 ,能达到控制所有样品色谱带 K' 值的这一事实,能够被我们用于分离、分析各种复杂样品。因此,溶剂强度(有的文献中称为洗出强度) ϵ^0 是选择分离条件时首先应考虑的一个参数。表2—1列出了用于极性吸附剂的溶剂表,此表的排列顺序是按照 ϵ^0 的大小依次排列的。

由表2—1可以看出,一系列溶剂按照 ϵ^0 的顺序排列,称为溶剂的洗出系列。在样品的分离过程中,如果开始时选用溶剂的 ϵ^0 太大,即可得到很小的 K' 值;这时应更换 ϵ^0 较小的溶剂,结果可以使 K' 值增大。同样,在开始时选用了 ϵ^0 太小的溶剂,得到样品的

表2-1 极性吸附剂 Al_2O_3 的溶剂表

溶 剂	ϵ° (Al_2O_3)	粘 度 cp 20°C	折 光 指 数 RI	紫外截止 波 长 (nm)	沸 点 (°C)	溶 剂	ϵ° (Al_2O_3)	粘 度 cp 20°C	折 光 指 数 RI	紫外截止 波 长 (nm)	沸 点 (°C)
全 氟 烃	-0.25	—	1.25	—	—	二氯乙烯	0.49	0.79	1.445	230	84
正 戊 烷	0.00	0.23	1.358	210	36	甲 乙 酮	0.51	0.43	1.381	330	79.6
异 辛 烷	0.01	0.54	1.404	210	118	丙 酮	0.56	0.32	1.359	330	56.2
正 乙 烷	0.01	0.32	1.38	210	69	乙酸乙酯	0.58	0.45	1.370	260	77.1
正 庚 烷	0.01	0.41	1.388	210	98.4	乙酸甲酯	0.60	0.3	1.362	260	57
环 己 烷	0.04	0.93	1.427	210	81	戊 醇	0.61	4.1	1.410	210	137.3
二硫化碳	0.15	0.37	1.626	380	45	苯 胺	0.62	4.4	1.586	325	184
四氯化碳	0.18	0.97	1.466	265	76.7	硝基甲烷	0.64	0.67	1.394	380	100.8
异 丙 醚	0.28	0.37	1.368	220	69	乙 腈	0.65	0.37	1.344	190	82
甲 苯	0.29	0.59	1.496	285	110.6	吡 啶	0.71	0.94	1.510	305	115.5
氯 苯	0.30	0.80	1.525	280	132	二甲亚砜	0.75	2.24	1.478	270	189
苯	0.32	0.65	1.501	280	80.1	异 丙 醇	0.82	2.3	1.38	210	82.4
溴 乙 烷	0.37	0.41	1.424	225	38.4	乙 醇	0.88	1.20	1.361	210	78.5
乙 醚	0.38	0.23	1.353	220	34.6	甲 醇	0.95	0.60	1.329	210	65
三氯甲烷	0.40	0.57	1.443	245	61.2	乙 二 醇	1.11	19.9	1.427	210	198
二氯甲烷	0.42	0.44	1.424	245	41	乙 酸	很大	1.26	1.372	251	118.5
四氢呋喃	0.45	0.55	1.404	210	66						

柱色谱法

K' 太大, 这时应更换 ϵ° 较大的溶剂。因此洗出序列表可用于以实验方法寻求最合适 ϵ° 的溶剂。

当初次选定移动相的 ϵ° 时, 不必使用吸附色谱柱, 应当用薄层色谱方法确定移动相的溶剂强度。但应记住, 将选出的最适溶剂强度 ϵ° 用于高效吸附柱时, 应选用比测得的 ϵ° 值略微弱一点的溶剂。

【混合溶剂强度】 实践证明: 吸附色谱法中使用溶剂混合物, 特别是二元溶剂做为流动相的, 比使用纯溶剂要好。使用二元溶剂有几个优点。第一, 通过改变二元系的组成, 可以连续地改变溶剂强度。第二, 通过选择适当溶剂, 可以选出粘度低的溶剂作为二元系的主要组分。则可能制备出低粘度的流动相, 这种流动相有利于获得高柱效。

在吸附色谱法中, 也可以通过改变溶剂组成的办法, 在保持溶剂强度 ϵ° 恒定的情况下, 改变溶剂的选择性。实际上, 这可以通过应用表2-2和图2-6中数据去做。例如: 使用氧化铝吸附剂时, 可参阅表2-2, 在分离中

使用正戊烷/苯二元溶剂。实验结果表明苯体积%为16%溶剂强度为0.15时很合适, 但相邻二组分的色谱带靠的太近。这时, 我们可以换用另一个 $\epsilon^\circ=0.15$ 的二元溶剂, 如9% $CHCl_3$ /正戊烷, 或3.5% 丙酮/正戊烷, 或者用100%的二硫化碳。这些二元溶剂(或纯溶剂 CS_2), 虽然溶剂强度相同, 但组成却完全改变了, 这样引起相邻两组分 $r_{f,1}$ 值的改变。在使用硅胶吸附剂时可参阅图2-6, 在不变 ϵ° 时, 用改变溶剂组成的办法, 改变选择性。这种试探方法常常是成功的, 但做起来比较费时间。

【溶剂的选择性】 二元溶剂的选择性方面, 也已发现到一些规律性的数据。这种规律仍表现在溶剂强度一定时, 通过改变溶剂组成, 使溶剂的选择性改变, 达到相邻的色谱峰 $r_{f,1}$ 值改变。这类数据的示例, 列在表2-3中。

表2-3列举的两个样品的组分是乙醚萜和二硝基萜, 表中左边列出的是具有相同 ϵ° 的二元溶剂, 其中溶剂A是最弱的正戊烷, 溶

表2-3 吸附色谱法中的溶剂选择性

溶剂A: 正戊烷				
组份甲		组份乙		
溶剂B 体积%	溶剂B名称	K'	K'	$r_{f,s}$ 值
50	苯	5.1	2.5	0.5
25	乙醚	2.5	2.9	1.16
23	二氯甲烷	5.5	5.8	1.05
4	乙酸乙酯	2.9	5.4	1.8
5	吡啶	2.3	5.4	2.4
0.05	二甲亚砜	1.0	3.5	3.5

剂B则是具有不同强度的溶剂,利用强溶剂B在二元溶剂里的体积%不同使配出的二元溶剂都具有相同的 ϵ^* 值。强溶剂B的浓度由苯时体积%为50%(苯的 $\epsilon^*=0.32$)逐渐降低到乙酸乙酯时的4%(乙酸乙酯的 $\epsilon^*=0.58$)直到二甲亚砜时的0.05%(二甲亚砜的 $\epsilon^*=0.75$)。所有二元溶剂的 ϵ^* 都近于0.25。当强溶剂B的浓度按表顺序逐渐下降时,我们可以看到 $r_{f,s}$ 值在有规律地提高。但应注意,由两组分的 K' 值可以看出,当 $r_{f,s}=0.5$ 和3.5时,两组分可以实现最大程度的分离。这时的二元溶剂中,如果使用 ϵ^* 小的B溶剂(例如苯为0.32)时,其体积%大(苯体积%=50);而使用 ϵ^* 大的B溶剂时(例如二甲亚砜为0.75),其体积%小(二甲亚砜体积%=0.05)。另外 $r_{f,s}$ 处于接近为1的情况下分离情况变坏。另外也要注意,表2-3中的B溶剂是按照强度顺序排列的,由此可以看出,当分离这类芳香化合物时,应选那些强度小或大的溶剂,并配合强度近于0的溶剂组成二元溶剂预计可以实现比较良好的分离。应用这一规律去估计表2-2中的二元溶剂时,也可以看出一氯丙烷为77%,以及乙酸甲酯为5%时,能得出最大的 $r_{f,s}$ 值,两峰的分离效果良好。

在选择溶剂达到最大选择性方面还应注意一个规律,这就是样品分子和溶剂之间发生氢键型相互作用,这种相互作用一般将会

引起 $r_{f,s}$ 值的重大改变。因此在二元溶剂中使用醇类做为一个组分。这与使用其他组分比起来,常常会得到不同的 $r_{f,s}$ 值。

2.2.2 液-液分配色谱法

(一)概述 液液分配色谱法是利用了溶质在互不相溶二液相间的分配这一原理,与气相色谱中的分配过程相似。色谱柱中的固定相是涂渍在惰性载体上的一种液体,它不能与流过色谱柱的流动相互溶,因此它又类似于互不相溶二液相间的萃取过程。但是液液色谱法比萃取过程的效率要大得多,这主要是固定相和流动相之间存在着更大的界面,而且组分(溶质)在两相间的分配平衡也迅速得多。

液液色谱法中,选择了固定相和流动相组成了液液系统,由于要求二液相应当不互溶,因而在这种方法里又分为两类。当选择固定相时选用了亲水性的化合物(溶剂),则流动相必须要选用疏水性的溶剂,这种系统称为正相(分配)色谱法;如果选用的情况恰好与上述相反,则称为反相(分配)色谱法。

使用惰性载体涂渍固定液的方法,存在着一个缺点,即固定液是机械地保持在载体表面上。一根色谱柱由于长期使用,流动相要长期从色谱柱流过,即使固定液在流动相中的溶解度极小,但它总是要溶解一点,这就造成了固定相的流失。色谱柱中固定液的涂渍量逐渐降低,引起柱效能发生改变,稳定性和重复性不能保证,所以液相色谱柱比气相色谱柱的使用期限较短。为了解决这一不足,近几年来又发展了适于分配系统的化学键合相。这种新型的固定相解决了这个问题,是现代高效液相色谱的重大发展。

液液分配色谱法的优点是使用范围广泛,性能稳定和重复性良好,是一种精确的定量方法。

(二)分配用固定相